Aus der WE Anatomie
der Freien Universität Berlin
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. med. Ewald Wüstenfeld

---

MORPHOLOGISCHE UNTERSUCHUNG DER WIRKUNG VON D-PENICILLAMIN AUF RATTENFOETEN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den
Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Liselotte Franke
aus Göttingen

1976

Aus der WE Anatomie
der Freien Universität Berlin
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr.med. Ewald Wüstenfeld

MORPHOLOGISCHE UNTERSUCHUNG DER WIRKUNG VON D-PENICILLAMIN AUF RATTENFOETEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Liselotte Franke
aus Göttingen

Referent: Professor Dr.med. Hans-Joachim Merker

Korreferent: Professor Dr.med. Helmut Kewitz

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Promoviert am: 20.8.1976

Inhaltsverzeichnis

Einleitung 1

Material und Methoden 9

Befunde

- Teratologische Befunde 12
- Lichtmikroskopische Befunde 14
- Enzymhistochemiche Befunde 15
- Elektronenmikroskopische Befunde 16

Diskussion 23

Zusammenfassung 35

Bildmaterial

Literaturverzeichnis

I. Einleitung

Bis vor einigen Jahren wurde der Begriff der sogenannten kritischen Periode, in der alle oder wenigstens die meisten Mißbildungen durch verschiedene Manipulation experimentell zu erzeugen sind, sehr starr interpretiert. Es konnte in letzter Zeit gezeigt werden, daß die Vorstellungen von der Existenz nur einer kritischen Periode für jeden Mißbildungstyp nicht haltbar sind (LONGDEN (1975); MERKER et al. (1975); MERKER (1975)). Es muss im Gegenteil davon ausgegangen werden, daß jede Entwicklung zu einer sichtbaren Struktur an sehr vielen Stellen gestört und unterbrochen werden kann. In Abhängigkeit von der Art der einwirkenden Schädigung und vom Stadium der betroffenen Entwicklung, existieren also mehrere oder eine Sequenz kritischer Phasen. Aus diesen Überlegungen geht hervor, daß die zeitliche Lokalisation des empfindlichen Abschnittes geprägt ist von der Beziehung zwischen der Art der einwirkenden Schädigung und der Art des ablaufenden morphogenetischen Prozesses. Bei der durch chemische Noxen ausgelösten Mißbildung kommt es deshalb neben dem Zeitpunkt wesentlich auf den Angriffsort und den Wirkungsmechanismus der verwendeten Substanz an.

Einige Beobachtungen, die in jüngster Zeit veröffentlicht wurden (ABRAMOVICH und DEVOTO (1968); HALL (1972); LEVENE und GROSS (1959); KING et al. (1971); MERKER et al. (1975); PONSETI und SHEPHARD (1954); PRATT und KING (1972); STEFFEK und HENDRIK (1972); STEFFEK et al. (1972); STIVERS et al. (1971); WILK et al. (1972); BEVELANDER et al. (1960); GROTE und MICAH (1971); CARTER und WILSON (1962);

SCHWEICHEL (1971) sprechen dafür, daß Substanzen, die die Bildung, Sekretion und Reifung der mesenchymalen Interzellularsubstanz angreifen, auch eine teratogene Wirkung haben. Die von diesen Substanzen beeinflussbaren Vorgänge im Mesenchym, laufen sehr lange nach der sogen. klassischen kritischen Periode ab. Während bei der Ratte die kritische Periode im engeren Sinne etwa zwischen Tag 9 und Tag 12 zu lokalisieren ist, beginnt die Bildung, Sekretion und Reifung der mesenchymalen Interzellularsubstanz in den Skelettanlagen frühestens am Tag 13 und dauert bis zur Geburt. Sind die mesenchymwirksamen Substanzen tatsächlich teratogen - was auf Grund der bisher vorliegenden Befunde vermutet werden muss - so muss die kritische Periode in diesem Falle zwischen Tag 13 und der Geburt (Tag 21) liegen. Der teratogene Effekt von Substanzen, die in der geschilderten Weise auf das embryonale Mesenchym wirken, scheint zunächst wenig verständlich. Bei der Prüfung und Auswertung der bisher vorliegenden Literatur und der in der normalen Embryologie erarbeiteten Grundlagen, bietet sich aber eine Erklärung dieses Phänomens an (AYDELOTTE (1971); FELL und MELNBY (1952); FELL und DINGLE (1956); DINGLE et al. (1966); SAXEN (1965, 1966, a.b.); McCALLUM und ARBUTHNOTT (1969); RAJAN (1969, 1971, a.b.); AYDELOTTE und KOCHHAR (1972); FELL und WEISS (1965); MERKER et al. (1972); ASSISSI und MERKER (1975); MERKER et al. (1975), (1975a); MERKER (1975)). Während der Entwicklung des Skelettsystems werden zunächst über ein sehr teratogenempfindliches Blastemstadium alle späteren Knochenstücke in Form von Knorpelmodellen angelegt. Diese Knorpelanlagen entsprechen in der

relativen Größe zueinander und in der Lokalisation bereits den späteren endgültigen Skelettverhältnissen. Nach Fertigstellung des sogenannten embryonalen Vorknorpels beginnt ein eigentümlicher Vorgang. Die Knorpelgrundsubstanz mineralisiert zunächst im Diaphysenbereich durch Einlagerung von Apatit-Kristallen. Gleichzeitig zeigen die Knorpelzellen in dieser Region eine vakuolige Degeneration (Blasenknorpel) und sterben ab. Während diese Vorgänge ablaufen, bildet sich um den diaphysären Bereich des embryonalen Vorknorpels eine Knochenmanschette auf desmaler Basis, d.h. nicht knorpelig vorgebildet über direkte Mineralisation des Bindegewebes. Nach Ausbildung der Knochenmanschette um den diaphysären Bereich des Knorpels, brechen von aussen neue Mesenchymzellen und Gefäße durch diese Hülle in den Blasenknorpelbereich hinein vor. Hier bauen sie die Knorpelgrundsubstanz zum größten Teil ab, phagocytieren die Trümmer der Zellen und beginnen mit der eigentlichen Knochenbildung auf den Resten des alten Knorpels. Die Mineralisation, das Zugrundegehen der alten Knorpelzellen, das Nachrücken der zweiten Mesenchymgeneration und die Neubildung des Knochens schreiten dann nach epiphysärwärts fort.

Aus der Beschreibung dieser Vorgänge ist ersichtlich, daß die Knorpelzellen der ersten Generation zugrunde gehen. Die Information über Lokalisation, relative Größe und Form, sowie die örtliche Beziehung der Skelettanlagen zueinander, wird aber dadurch allein von der azellulären Interzellularsubstanz des Knorpels weitergegeben. Es ist

deshalb verständlich, daß eine Störung oder sogar vollständige Hemmung der Bildung oder Reifung der Interzellularsubstanz auch eine Störung der Skelettentwicklung zur Folge haben muss. Wird die Synthese oder Sekretion fast völlig gehemmt, muss in Abhängigkeit von der Zeit - da auch bei der Entwicklung des Extremitätenskelettes ein proximocaudales Reifungsgefälle zu beobachten ist - eine Aplasie oder zumindest ausgeprägte Hypoplasie bestimmter Skelettanteile resultieren. Und dazu wäre es natürlich notwendig, von Beginn der mesenchymalen Interzellularsubstanzproduktion an, die in diesem Sinne wirkende teratogene Substanz einwirken zu lassen. Darüberhinaus schliessen sich noch andere Schritte der Skelettogenese an, die ebenfalls mit Substanzen, die die Synthese, Sekretion und Reifung der bindegewebigen Interzellularsubstanz beeinflussen, gestört werden können. Hier ist einmal zu nennen die Bedeutung der Interzellularsubstanz für alle Mineralisationsprozesse, d.h. in diesem Falle für die Osteogenese. Aus allen Untersuchungen des Mineralisationsprozesses geht hervor, daß sowohl die Glukoseaminoglykane - in förderndem oder hemmendem Sinne - als auch ein ganz bestimmter Aufbau des Kollagens zur Verankerung der Apatitkristalle Voraussetzung sind (BACHRA and FISHER (1968); GLIMSCHER et al. (1957); HALLSWORTH (1964); LARSSON et al. (1973); MEYER et al. (1972); PATNAIK (1970); ROBINSON (1952)). Es muss deshalb zunächst postuliert werden, daß sowohl quantitative als auch qualitative Veränderungen im Kollagengehalt an den entsprechenden Stellen zu Mineralisationsstörungen während der Osteogenese führen müssen. Die Störung

der Mineralisation spielt während der Morphogenese des Skelettes zunächst bei der Bildung der perichondralen Knochenmanschette eine wichtige Rolle. Dieser Knochenmantel um den diaphysären Bereich des Knorpelmodells stabilisiert dessen Form während des Ab- bzw. Umbaues. Kann das nur unvollständig mineralisierte Knochenkorsett diese Funktion nicht erfüllen, bricht das Knorpelmodell zusammen und es kommt zu Verkürzungen oder starken Verformungen des betroffenen Skelettstückes (MERKER et al. (1975)). Im weiteren Verlauf der Ereignisse spielt die Interzellularsubstanz bei den jetzt in ausgeprägtem Maße ablaufenden Prozessen der chondralen Osteogenese im Rahmen des Knochenwachstums eine wesentliche Rolle. Quantitative und qualitative Störungen der Interzellularsubstanz müßten Auswirkungen auf die Mineralisation haben und zumindest quantitativ die Skelettentwicklung beeinflussen. Auf der Grundlage dieser Überlegungen, die aus der normalen Skelettentwicklung abgeleitet werden können, lassen sich also die teratogenen Effekte nach Gabe von bindegewebswirksamen Medikamenten erklären. Es ist deshalb durchaus berechtigt, auf dem Boden dieser Hypothese solche bindegewebswirksamen Substanzen zu testen. Als besonders interessante Substanz bietet sich hier das "D-Penicillamin" an. Die Wirkung des D-Penicillaminsist wahrscheinlich auf die Hemmung der Quervernetzung der Tropokollagenmoleküle beim Aufbau zu grösseren Einheiten, d.h. zum stabilen Kollagen zurückzuführen (NIMNI et al. (1969, 1970, 1972); DESHMUKH und NIMNI (1969)). In diesen Untersuchungen wurde gezeigt, daß der Anteil des neutralsalzlöslichen,

d.h. des unreifen Kollagens und der Aldehydgehalt nach Penicillamingabe steigen. Das ist darauf zurückzuführen, daß sich das Penicillamin mit den intermediär entstehenden Aldehydgruppen des Tropokollagenmoleküls reversibel zu Thiazolidinderivaten verbindet. Da diese Aldehydgruppen für die weitere Polymerisation der Tropokollagenmoleküle notwendig sind, verhindert das Penicillamin auf diese Weise die Quervernetzung, was zur Akkumulation der löslichen Moleküle im Interzellularraum führt. Darüber hinaus kann Penicillamin mit den bei der Quervernetzung primär entstehenden Aldiminen vor deren Stabilisierung reagieren, so daß ein Teil des bereits vernetzten Kollagens wieder von der Fibrille abgelöst wird. Tatsächlich konnte nach Gaben von D-Penicillamin eine teratogene Wirkung beim Menschen bereits beschrieben werden.
(Lit. siehe MERKER et al. (1975))

Damit wären die bisher erörterten Vorstellungen von einer "kritischen Phase" auch nach Ausbildung des Blastems durch eine Beeinflussung der mesenchymalen Reifung und Funktion bestätigt. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe MERKER konnte die Entstehung der embryonalen Skelettveränderungen nach Gaben von D-Penicillamin in der zweiten Hälfte der Schwangerschaft morphologisch verfolgt werden (MERKER et al. (1975)). Nach Abschluss dieser Untersuchungen schien es sinnvoll, die dabei erzielten Ergebnisse mit einem größeren Tiermaterial zu untermauern, um exaktere Dosiswirkungsbeziehungen aufstellen und den Angriffsmechanismus der Substanz durch Anwendung neuer morphologischer Methoden etwas besser

definieren zu können. Neben einer erneuten elektronenmikroskopischen Untersuchung sollte dem Verhalten der Aktivität der alkalischen Phosphatase und der automatischen Messung der mineralisierten Knochenabschnitte nach Alizarinrot-Anfärbung besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden.
Die elektronenmikroskopische Untersuchung erscheint sinnvoll, da einmal die feinstrukturellen Veränderungen der kollagenen Strukturen unter der Wirkung des D-Penicillamins noch nicht genügend dargestellt sind. MERKER et al. (1975) konnte erstmals Schwellungen der kollagenen Fibrillen darstellen. Für die genaue Deutung dieses Phänomens musste aber das Ausmaß, die Verbreitung und die Lokalisation solcher Veränderungen bekannt sein. Ausserdem muss geprüft werden, ob die Zellen selbst, wie unter dem Einfluss von L-Penicillamin, morphologische Zeichen einer Hemmung der Synthese zeigen.

Die alkalische Phosphatase stellt ein Schlüsselenzym der Mineralisation dar (Lit. siehe TELLER et al. (1971)). Der eigentliche Wirkungsmechanismus ist allerdings noch nicht sicher geklärt, besonders seine Beziehung zur Pyrophosphatase, die durch Spaltung von PP_1 dessen mineralisierungshemmende Wirkung aufheben soll. Die Prüfung des Verhaltens dieses wichtigen Enzyms sollte deshalb bei jedem Interpretationsversuch einer D-Penicillamin-Wirkung durchgeführt sein (RAAB und MÖRTH (1974)).

Die automatische Messung der mit Alizarinrot gefärbten Knochenabschnitte ist aus zwei Gründen sinnvoll: Einmal ist diese Methode durch Ausschaltung der individuellen Fehler viel genauer als die

Befundung mit der Messlupe. Das automatische Meßsystem ist natürlich empfindlicher und misst, während ein Lichtstrahl des Cytophotometers das Skelettstück mäanderförmig abtastet, nicht nur die Länge, sondern auch die Fläche. Dann erschien es aber auch wichtig, an diesem Beispiel die Genauigkeit beider Methoden gegeneinander abzuwägen. Da aus den vorausgegangenen Untersuchungen vermutet werden kann, daß durch D-Penicillamin eine Mineralisationsstörung und eine Verkürzung der mineralisierten Abschnitte erzielt werden, wäre durch Erfassung solcher Werte die Aufstellung genauer Dosis-Wirkungsbeziehungen möglich.

In der folgenden Arbeit soll deshalb die embryotoxische Wirkung des D-Penicillamins in der zweiten Hälfte der Schwangerschaft unter Berücksichtigung der oben erläuterten Vorstellungen erneut untersucht werden.

II. Material und Methoden

Als Untersuchungsmaterial dienten Ratten des Wistarstammes (Paderborn FW 69). Zur genauen Bestimmung der Schwangerschaftsdauer wurden die Tiere an einen veränderten Tag-Nachtrhythmus adaptiert. Weibliche Tiere im Östrus wurden vormittags zwischen 7.30 h und 9.30 h mit Böcken gepaart. Da bereits um 8.00 h 80% der weiblichen Tiere spermienpositiv waren, setzten wir diesen Zeitpunkt als Stunde 0, d.h. als Schwangerschaftsbeginn fest. Die folgenden 24 Stunden entsprachen damit dem Tag 0. Die Stundenzahlen werden auf 8.00 h bezogen und können dadurch ebenfalls berücksichtigt werden.

An den Tagen 15-19 der Gestation erhielten gravide Ratten zweimal täglich (10.oo h und 16.oo h) eine intraperitoneale Injektion von D-Penicillamin (Heyl, Berlin) in NaCl-Lösung. Die Einzeldosen betrugen für je 25 Tiere 20, 50 oder 100 mg pro Tier. Somit betrugen die Gesamtdosen 200, 500 oder 1000 mg pro Tier. Nicht behandelte Tiere, oder Tiere, die pro Tag zwei intraperitoneale Injektionen NaCl-Lösung erhalten hatten, dienten als Kontrollen. An den Tagen 16, 17 und 18 wurde jeweils ein Muttertier, am Tag 20 der Rest der Muttertiere getötet und die Embryonen durch Schnittentbindung geboren. Dabei wurden die Zahl der Embryonen pro Muttertier, ihr Gewicht und ihr makroskopisches Aussehen protokolliert. Für die elektronenoptische Untersuchung wurde mindestens ein Embryo jedes Muttertieres sofort in einer Lösung, welche aus

3% Paraformaldehyd und 3% Glutaraldehyd in 0,2 M Cacodylatpuffer (pH 7,4) bestand, fixiert. Die Nachfixierung erfolgte in 1% OsO_4-Cacodylatlösung, die Einbettung in Mikropal (Ferak, Berlin). Danach erfolgte die Anfertigung von Ultradünnschnitten auf dem LKB- oder Reichert-Mikrotom. Die Schnitte wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert und unter Verwendung des Elmiskopes 1 oder 101 untersucht. Zur Orientierung in den Präparaten und um die interessierenden Regionen der Extremitätenknospen auffinden zu können, wurden 1μ dicke Schnitte hergestellt, die für eine Minute in alkalischer Giemsalösung bei 60° gefärbt wurden. Mindestens 1 Embryo/Muttertier wurde für die lichtmikroskopische Untersuchung aufgearbeitet. Nach Herausnahme der Embryonen wurden die Extremitäten abgetrennt und in Bouin'scher Lösung fixiert. Die Entwässerung erfolgte in einer aufsteigenden Alkoholreihe, die Einbettung in Paraffin über Methylbenzoat. Daraufhin wurden 7μ dicke Schnitte angefertigt, die entweder mit Hämalaun-Eosin (HE), Azan oder PAS gefärbt wurden.

Die verbleibenden Embryonen des Tages 20 wurden nach Herausnahme in toto für die Dauer einer Woche in Formol fixiert. Danach erfolgte, mittels eines Bauchschnittes, die Entfernung der Thorax- und Abdominalorgane. Nach 24-stündiger Wässerung in Leitungswasser wurden die Embryonen für eine Woche in eine Lösung von 1 Teil Äther und 3 Teilen abs. Alkohol gegeben, und danach für 3-5 Tage in eine Lösung von 10% KOH und 0,3%

wässrige Alizarinlösung. Nach genügend starker Anfärbung der mineralisierten Skelettanteile wurden die Embryonen 12 Stunden gewässert und für einige Stunden in eine Lösung, bestehend aus 1 Teil Benzylalkohol, 2 Teilen abs. Alkohol und 2 Teilen Glycerin, gebracht. Die Aufbewahrung erfolgte in Glycerin.

Die Untersuchung bestand in einer Musterung auf Aplasien, Hypoplasien und Verformungen, sowie in der Längenmessung der mineralisierten Skelettanteile sowohl mittels eines ZEISS-Meßokkulares als auch mit einer linearanalytischen automatischen Meßeinheit "Digiscan" der Firma Kontron. Die alkalische Phosphatase wurde nach der hier im Institut modifizierten und biochemisch getesteten Methode von TELLER et al. (1971) nachgewiesen.

III. Befunde

a) Teratologische Befunde

Bei den Gruppen der Embryonen, die 200 oder 500 mg D-Penicillamin pro Muttertier erhalten hatten, zeigten sich weder in der Anzahl (Resorptionen: 1,4%) noch in dem Gewicht der Embryonen Abweichungen von der Norm. Das Gewicht der Kontrollen betrug 3,25±0,25, das der ersten Gruppe 3,20±0,39 und das der zweiten Gruppe 3,8±0,36. Die Zahl der Embryonen pro Muttertier betrug in den drei Gruppen 8-9. Schwerwiegende und äusserlich sichtbare Missbildungen liessen sich nicht feststellen. Bei der Gruppe der Embryonen, die 1000 mg pro Muttertier D-Penicillamin erhalten hatte, war die Anzahl der Embryonen pro schwangerem Tier (7-8) nicht signifikant geringer als die der Kontrollgruppe. Die Zahl der Resorptionen betrug in dieser Gruppe 1,6%. Das Gewicht der Embryonen aus dieser Gruppe zeigte aber eine signifikante Verringerung im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Wir fanden bei den Kontrolltieren Werte von 3,25±0,25g (Mittelwert ± Standardabweichung), bei den mit 1000 mg pro Tier D-Penicillamin behandelten Embryonen 2,32±0,41g.

Die Begutachtung von 180 aufgehellten und mit Alizarinrot gefärbten Embryonen vom Tag 20 erbrachte Zeichen einer mannigfaltigen Schädigung des Skelettsystems (Abb. 1 bis 3). Am häufigsten beobachteten wir Deformitäten der Rippen und unvollständige Mineralisation der Wirbelkörper, die teilweise auch ganz fehlten oder eine

horizontale Spalte aufwiesen. Ein weiterer, oft beobachteter Befund war das Fehlen der Metatarsalknochen, weniger häufig das der Metacarpalknochen. Die langen Extremitätenknochen wiesen einige Deformitäten und unvollständige Mineralisationen auf. Weitere Befunde konnten an den Schädelknochen, die ebenfalls unvollständig mineralisiert waren, an dem Sternum und an dem Becken erhoben werden. Sowohl an dem Sternum als auch an der Beckenanlage stellten wir das Fehlen von Knochenkernen fest (Tab. I). Unter dem Begriff "unvollständige Mineralisation" verstehen wir eine nur mangelhafte Anfärbung der Skeletteile mit Alizarinrot. Wegen der Komplexbildung zwischen Ca-Salzen des Knochens mit diesem Farbstoff glauben wir uns berechtigt, die verringerte Farbstoffaufnahme mit einer verringerten Mineralisation zu erklären. Während normalerweise die Anfärbung so stark ist, daß keine Einzelheiten im Knochenstück sichtbar werden, sind in diesem Falle feine Knochenzeichnungen zu erkennen.

Die Längenmessung der langen Extremitätenknochen zeigte bei der Gruppe der 20 Tage alten Embryonen, die 1000 mg pro Tier D-Penicillamin erhalten hatten, signifikante Verkürzungen. Die noch mit dem ZEISS-Meßokkular gemessenen Werte (siehe MERKER et al. (1975)) zeigen diese Verkürzung ganz deutlich (Tab. II). Die mit dem automatisch und linearanalytisch messenden "Digiscan" erhobenen Befunde an den in dieser Arbeit ausgewerteten Tiergruppen, stimmen mit den Zahlen bis hinter das Komma überein. Hier sind noch Versuche

im Gange, solche Messungen auch flächenanalytisch durchzuführen (mit dem Quantimet), um dann vergleichend zu diesen Methoden Stellung nehmen zu können (SCHUMACHER und MERKER (1975)). Dieser Befund konnte jedoch nicht bei den kurzen Extremitätenknochen erhoben werden.

b) Lichtmikroskopische Befunde

Die lichtmikroskopische Untersuchung des Knorpels der Extremitätenknospen der 16 und 17 Tage alten Embryonen, also der Embryonen, die noch keine Verknöcherung aufweisen, zeigte lediglich eine geringe Reduktion in der Grösse, die statistisch nicht immer signifikant war. Zweifellos sind die weiter oben bereits geschilderten Untersuchungen an alizarinrot gefärbten Präparaten und deren automatische Messung sehr viel nützlicher bei quantitativen Aussagen. Morphologische Abweichungen von der Norm konnten zu diesem Zeitpunkt nicht beobachtet werden. Bei den 20 Tage alten Embryonen hingegen fanden wir bereits starke Veränderungen des mineralisierten Skeletts.

Die sich um den diaphysären Bereich am Tag 17 entwickelnde perichondrale Knochenmanschette war wesentlich geringer ausgebildet als bei den Kontrolltieren (Abb. 4). Während bei den unbehandelten Embryonen die äussere Kontur der langen Knochen, die im wesentlichen von der perichondralen Knochenmanschette abhängt, geradlinig von dem epiphysären Knorpel zu den diaphysären Knochen verläuft, fehlt diese scharfe Begrenzung

bei den behandelten Embryonen. Eine weitere Abweichung von dem Normalbild war, daß die verknöcherte Diaphyse einen geringeren Durchmesser aufwies als die Region der vakuolisierten Knorpelzellen. Die Vakuolisierung der Knorpelzellen und der Zusammenbruch der Interzellularsubstanz schritt aber dennoch in unveränderter Weise fort. In Abhängigkeit von dem Fehlen des stabilisierenden Knochenkorsetts treten Distorsionen und Zusammenbrüche der Knochen auf. Es musste weiterhin festgestellt werden, daß das Ausmaß aller folgenden Mineralisationsprozesse ebenfalls stark vermindert war. Dieses hatte zur Folge, daß sowohl der Durchmesser des gesamten Knochens als auch die Dicke der einzelnen Knochenbälkchen verringert waren. Auf diese Weise nimmt der Knochen ein mehr zartes Aussehen an und die zellulären Elemente überwiegen. An den übrigen, lichtmikroskopisch beurteilbaren Strukturen wie z.B. Gelenke, Sehnen, Muskeln, Blutgefäße und Nerven, lassen sich keine deutlichen Abweichungen von der Norm feststellen.

c) Enzymhistochemische Befunde

Für diese Untersuchungen wurde die alkalische Phosphatase mit der von TELLER et al. (1971) benutzten Methode vom Tag 16 bis 20 histochemisch nachgewiesen. Dabei verhalten sich besonders die desmalen Ossifikationszonen der perichondralen Knochenmanschette im Diaphysenbereich positiv. Eine etwas geringere Aktivität zeigen die chondralen Ossifikationszonen in

der primären Markhöhle und die Zonen des Blasenknorpels, die Apatit-Kristalle einlagern (Abb. 8a). Zwischen den D-Penicillamin-behandelten Tieren und den unbehandelten Kontrollen lassen sich in keiner der drei behandelten Dosisgruppen und zu keinem Zeitpunkt mit dieser enzymhistochemischen Methode Unterschiede in Quantität und Lokalisation nachweisen (Abb. 8).

d) Elektronenmikroskopische Befunde

Auf die systematische Beschreibung der normalen morphologischen Verhältnisse im wachsenden bzw. sich differenzierenden Skelettsystem soll hier verzichtet werden. Es existieren eine Fülle von Publikationen, die auf diese Problematik nahe eingehen (Lit. siehe MERKER (1975)). Nur im Rahmen der Gegenüberstellung zu pathologisch veränderten Strukturen des Skeletts wird jeweils auf die Normalsituation hingewiesen. Dabei ist zu berücksichtigen, daß auch bei dieser hohen Auflösung in den mit insgesamt 200 oder 500 mg/kg D-Penicillamin-behandelten Tieren keine strukturellen Abweichungen von der Norm nachweisbar waren.

An folgenden Strukturen lassen sich elektronenmikroskopisch unter dem Einfluss von 1000 mg/Tier D-Penicillamin Veränderungen erfassen.

1) Kollagene Fibrillen:
Diese kollagenen Fibrillen zeigen einmal deutliche Schwellungserscheinungen (Abb. 6). Während die Fibrillen im Bereich der späteren desmalen perichondralen Ossifikationszone unbehandelt eine Dicke von 200-300 Å haben, nimmt dieser Wert unter der angegebenen D-Penicillamin-Behandlung bis auf 500 Å zu. Auffällig ist dabei das lokalisationsabhängige Verhalten der Fibrillendicken. Während in umschriebenen Zonen die Dickenwerte noch normal sind, zeigen andere Regionen übereinstimmend Schwellungserscheinungen (Abb. 6). Da die Fibrillen mit einer geringeren Dicke (etwa 200 Å) zu dieser Entwicklungsphase noch keine sichere periodische Querstreifung zeigen und die dickeren Fibrillen (300 Å) erst eine kontinuierliche, d.h. noch nicht sicher eine periodische Querstreifung zeigen, ist es schwierig, über Veränderungen dieses Wertes bei geschwollenen Fibrillen Aussagen zu machen.

Eine weitere Veränderung der kollagenen Strukturen nach D-Penicillamin-Behandlung (1000 mg Gruppe) betrifft ihre Menge. Es gibt Bezirke mit normalerweise einer Fülle von kollagenen Fibrillen, die jetzt nur noch sehr wenige oder sogar überhaupt keine Fibrillen mehr enthalten. So sind die typischen Osteoblasten der chondralen Ossifikationsbereiche jetzt von einer elektronenmikroskopisch weitgehend leeren Zone

umgeben. Bei unbehandelten Tieren lassen sich hier die Fibrillen des Osteoids darstellen. Die Vermutung liegt nahe, daß besonders die Bezirke betroffen sind, die eine starke Fibrillogeneseaktivität während der Behandlung aufweisen. Allerdings muss hier gleich noch eine methodenkritische Betrachtung angeschlossen werden. Natürlich bedeutet das Fehlen von kollagenen Strukturen nicht eine Synthesehemmung des Kollagens (Abb. 7). Man muss eher davon ausgehen, daß gerade bei neugebildetem Kollagen unter dem Einfluss des Lathyrogens D-Penicillamin die Quervernetzung und damit die Aggregation der kollagenen Vorstufen besonders stark gestört ist. Damit nimmt aber die Löslichkeit des Kollagens stark zu. Zur Vorbereitung für die elektronenmikroskopische Untersuchung, müssen wir aber das Gewebe mit verschiedenen Flüssigkeiten und Lösungen in Verbindung bringen. Dabei geht offenbar das leicht lösliche und nicht vernetzte Kollagen verloren. An diesen Stellen erscheint deshalb der Interzellularraum elektronenmikroskopisch leer.

2) Morphologisches Verhalten der Apatit-Kristalle: Hier sind zunächst massive quantitative Abweichungen von der Norm zu erfassen. In weiten Bereichen sind bei den unbehandelten Tieren in der perichondralen Knochenmanschette die anfänglich isolierten Apatit-Drusen zu weiten, voll mineralisierten Abschnitten zusammengeflossen. Eine feinere Struktur ist durch die extreme Elektronendichte in diesen Gebieten auch elektronenmikroskopisch nicht sicher

darzustellen. Erst bei höheren Vergrößerungen und bei besonders dünnen Schnitten kann andeutungsweise eine etagenförmige Lokalisation der Apatit-Kristalle um die kollagenen Fibrillen herum, wahrscheinlich in Abhängigkeit von der periodischen Querstreifung, dargestellt werden. In den behandelten Tieren (1000 mg D-Penicillamin) ist auf weiten Strecken ein Zusammenfließen der Apatit-Kristalle nicht erfolgt (Abb. 5 u. 6). Diese Ca^{++}-Depots liegen noch isoliert und machen häufig auch nicht die normalen Vorgänge des Wachstums mit. Sie werden allmählich vor dem Zusammenfließen immer größer. Ist es in kleineren Bezirken zu einer Vereinigung gekommen, so liegen hier die einzelnen Apatit-Kristalle nicht in einer geordneten räumlichen Beziehung, d.h. etagenartig zu den kollagenen Fibrillen.

Auf einen weiteren, für die Theorie der Mineralisation sehr interessanten Befund soll in diesem Zusammenhang noch hingewiesen werden. In den oben bereits beschriebenen Arealen, die unter der Behandlung keine kollagenen Strukturen enthalten, finden sich dennoch Apatit-Drusen (Abb. 7). Trotz hoher Auflösung lassen sich an diesen Kristallaggregaten und an den Einzelfibrillen selbst keine morphologischen Abweichungen von der Norm erfassen. Allerdings fällt eine enge räumliche Nähe zu den dort liegenden Mesenchymzellen auf. Einzelne Aggregate können sich sogar auf relativ weiten Strecken an die Membran solcher Zellen anschmiegen (Abb. 7).

An den zellulären Elementen des Skelettsystems (Osteoblasten, Chondroblasten, perichondrale und periostale Mesenchymzellen, sowie Zellen der Gefäßwand) lassen sich elektronenmikroskopisch keine sicheren Veränderungen darstellen.

Art der Skelettveränderungen	Anzahl der Embryonen mit Missbildungen
Verformung der Rippen	125
Fehlen von Wirbelkörpern	42
Unvollständige Mineralisation der Wirbelkörper	110
Wirbelkörper mit einem horizontalen Spalt	15
Unvollständige Mineralisation der Schädelknochen	28
Fehlen von Knochenkernen im Sternum	21
Unvollständige Mineralisation der Beckenknochen	10
Verbiegungen der langen Röhrenknochen	31
Fehlen der Metacarpalknochen	14
Fehlen der Metatarsalknochen	76
Unvollständige Mineralisation	5

Tabelle I

Skelettveränderungen bei 180 Embryonen (Ratte Tag 20) nach Applikation von insgesamt 1000 mg/kg D-Penicillamin an den Tagen 15-19

		Kontrollen	D-Penicillamin-behandelt	
Humerus	r	27.6 ± 2.21	23.1 ± 3.13	P=0.002
	l	27.6 ± 2.34	23.6 ± 3.45	
Ulna	r	28.4 ± 2.32	25.0 ± 3.43	P=0.002
	l	28.19 ± 2.36	25.3 ± 3.5	
Radius	r	21.93 ± 1.93	19.8 ± 2.64	P=0.002
		22.34 ± 2.08	-	
Femur	r	19.4 ± 1.85	16.9 ± 2.49	
	l	19.34 ± 1.87	16.8 ± 2.83	P=0.002
Tibia	r	23.73 ± 2.49	20.8 ± 2.66	P=0.002
	l	23.31 ± 1.88	20.7 ± 3.13	
Fibula	r	21.67 ± 2.12	20.7 ± 3.13	P=0.01
	l	22.05 ± 2.28	20.5 ± 3.09	

Tabelle II

Die Länge der langen Röhrenknochen von Rattenfoeten (in 1/10 mm) am Tag 20. Die Muttertiere erhielten entweder 200 mg D-Penicillamin/Tier/Tag vom Tag 15-19 der Schwangerscaft (130 Foeten) oder waren unbehandelt (100 Foeten).

Aus der Arbeit "The Effect of D-Penicillamin of the Skeletal Development of Rat Foetuses" (MERKER et al. (1975))

IV. Diskussion

Aus diesen Befunden geht hervor, daß D-Penicillamin, in der zweiten Hälfte der Schwangerschaft gegeben, deutliche Effekte am Skelettsystem der Embryonen verursacht. Daraus kann auf einen Übertritt des Penicillamins von der Mutter auf den Embryo geschlossen werden, da die erhaltenen Veränderungen eine gewisse Spezifität aufweisen und nicht mit einer Schädigung der Mutter zu erklären sind. Die geschilderten Skelettveränderungen, die mit der Alizarinrot-Aufhellungsmethode erfasst werden, lassen sich in verschiedene Gruppen gliedern:

1) Verkürzungen bzw. Verkleinerungen (Hypoplasien)
2) Aplasien einzelner Skelettstücke
3) Verformungen
4) Aufhellungen (Veränderungen des Mineralisationsgrades)

Hypoplasien und Aplasien können teilweise erklärt werden mit einer Wachstumsretardierung und Reifungshemmung des Gesamtembryos. So werden die Metacarpalia, Metatarsalia, die caudalen Wirbelanlagen und die Knochenkerne im Sternum relativ spät angelegt. Andere Skelettstücke wachsen beträchtlich in den letzten Schwangerschaftstagen (lange Röhrenknochen und platte Schädelknochen). Eine Reifungshemmung von 48 Stunden würde bedeuten, daß diese Knochen noch nicht angelegt bzw. verkürzt und kleiner wären. Wie aus der Verringerung des Gewichtes der Embryonen hervorgeht, liegt ein derartiger Effekt tatsächlich vor. Jedoch können nicht alle Aplasien und Hypoplasien mit einer Retardierung

erklärt werden. Es kommen solche Veränderungen auch an anderen Stellen des Skelettsystems vor, z.B. im Bereich der Wirbelsäule und der Schädelknochen, wo sie mit einer Reifungshemmung allein nicht zu erklären sind. So sind z.B. einzelne Knochen der Wirbelsäule nicht nachweisbar, obwohl weiter caudal die Verhältnisse normal, d.h. Wirbel wieder vorhanden sind. Eine Retardierung unter den hier benutzten Bedingungen müßte aber allein mit einem caudalen Effekt des cranio-caudalen Reifungszerfalls einhergehen. Darüberhinaus ist die Verkürzung der einzelnen Knochen nicht proportional zueinander, und auch in manchen Knochen stärker als im Vergleich mit der Verminderung des Geburtsgewichtes zu erwarten wäre. Für eine spezifische Wirkung des D-Penicillamins auf das Skelett der Foeten sprechen auch Untersuchungen mit einer Substanz, die zwar wie D-Penicillamin ein Chelatbildner ist, doch keine spezifischen Effekte auf das Kollagen besitzt (persönl. Mitteilung, MERKER). Hier finden wir ebenfalls ein Fehlen der Metatarsalia, Metacarpalia, Knochenkerne im Sternum, angedeutete Verkürzung der langen Röhrenknochen und Verkleinerung der Schädelknochen. Jedoch können die anderen Aplasieformen nicht beobachtet werden und der Verkürzungsgrad ist geringer. Es muss deshalb ein Teil des Effektes von D-Penicillamin auf das sich entwickelnde Skelettsystem der embryonalen Ratte auf den spezifischen Angriffspunkt der Substanz am Bindegewebe bezogen werden.

Die elektronenmikroskopisch fassbaren Effekte der D-Penicillamin-Behandlung sind vorwiegend auf den Angriffspunkt am Kollagen zu beziehen. Dieser Gesichtspunkt wurde bereits in einer vorhergehenden Arbeit eingehender diskutiert (MERKER et al. (1975)). Es lassen sich drei immer wiederkehrende Befunde erfassen:
1) Verringerte Zahl der Kollagenstrukturen
2) Schwellung der Fibrillen
3) Verringerte oder ungeordnete Mineralisierung.
Durch die penicillaminbedingte Aggregationsstörung des Kollagens findet sich neu sezerniertes Kollagen von nicht zu großen Einheiten (Fehlen von Kollagenstrukturen) oder aggregiert nicht ordnungsgemäß, bzw. bereits aggregiertes Kollagen schwillt. Da die Mineralisation von der hochgeordneten, dreidimensionalen Struktur der Kollagenfibrillen abhängt, ist eine Störung dieser Vorgänge bei Aggregationshemmung gut verständlich (BACHRA and FISHER (1968); ROBINSON (1952)). Als Nebenbefund - für die Mineralisationsvorstellung aber trotzdem interessant - sollte das Vorkommen von ersten Apatit-Niederschlägen in kollagenfreien Bezirken erwähnt werden. Offenbar ist also nicht die Initialzündung, sondern die spätere exakte Anordnung der Apatit-Kristalle mit der ungestörten Fibrillenstruktur verknüpft. Diese Vorstellung wird von neuen Anschauungen über den Mineralisationsprozeß bestätigt. Offenbar ist der Beginn der Mineralisation weniger an die Kalkfängereigenschaften des Kollagens als an die aktive Leistung der Osteoblasten geknüpft.

Diese Leistung kann auf Akkumulation und Sekretion von Calciumsalzen, aber auch auf der Bildung und Sekretion von Enzymen (alkalische Phosphatase) beruhen. (Ist dieser Prozeß eingeleitet, kann er sich verselbständigen und ein kollagenabhängiges Kristallmuster bilden. Dieses Muster bzw. eine dreidimensionale Kollagenkristallfunktionseinheit ist aber für die mechanische Belastbarkeit notwendig. Man sollte und kann deshalb auch die Mineralisation in verschiedene Schritte gliedern. Die ersten Schritte: Akkumulation von amorphen Calciumsalzen und Aufwachsen der Kristalle in umschriebenen Arealen ist nicht stärker durch D-Penicillamin und damit wohl auch nicht kollagenabhängig.)

Durch diese Befunde wird auch das durch D-Penicillamin unbeeinflusste Verhalten der alkalischen Phosphatase verständlich. Sicher spielt dieses Enzym eine wesentliche Rolle bei der Einleitung des Mineralisationsprozesses (Lit. siehe TELLER et al. (1971)).Die D-Penicillamin-bedingte Störung der Mineralisation hätte durch eine Hemmung dieses Enzyms gestört werden können - sei es durch Störung der Synthese oder durch andersartige Aktivitätshemmungen. Durch Spaltung eines Hemmfaktors, z.B. der Pyrophosphatase, wäre das Enzym besonders für den Beginn der Mineralisation wichtig. Aber gerade die Anfangsschritte sind unbeeinflusst. Es ist deshalb nicht überraschend, daß die enzym-histochemisch nachweisbare Aktivität des Enzyms sich bei Behandlung mit D-Penicillamin nicht verändert. Dafür spricht

auch das Vorkommen von sogen. Bonucci-Körpern in den Gebieten der beginnenden Mineralisation. Diese membranbegrenzten Partikel sind die Träger und die Transportform der alkalischen Phosphatase (TELLER et al. (1971)).

Die von RAAB mit MÖRTH (1974) gefundene Hemmung der Aktivität dieses Enzyms durch D-Penicillamin konnte also mit dieser Methode nicht bestätigt werden. Das kann natürlich verschiedene Ursachen haben. Einmal berücksichtigten die Autoren nur die Phosphatase in der Niere, im Serum und im Darm. Das entsprechende Enzym in der Skelettentwicklung kann sich völlig anders verhalten und braucht mit den hier gemessenen Werten nicht identisch zu sein. Natürlich ist eine kritische Stellung gegenüber allen quantitativen Versuchen in der Enzymhistochemie am Platze. Die oben besprochenen Überlegungen und das Fehlen eines erfassbaren Unterschiedes in der Aktivität dieses Enzyms, lassen aber eine Wirkung des D-Penicillamins an dieser Stelle als wenig wahrscheinlich gelten.

Da die Aussagen über teratogene Wirkungen am Skelettsystem hauptsächlich auf den Ergebnissen der Alizarinrot-Aufhellungen beruhen, muss an dieser Stelle eine Methodenkritik durchgeführt werden. Mit Alizarinrot weist man nur mineralisierte Abschnitte nach, da diese Substanz mit Calziumsalzen einen Komplex bildet. Das Fehlen von angefärbten Skelettstücken weist also nur auf eine ausgebliebene Mineralisation hin, nicht auf ein Fehlen der knorpeligen Skelettanlage. Tatsächlich konnten nach

Gabe von 6-Mercaptopurin - trotz Fehlen von alizarinrotpositiven Strukturen - Knorpelstücke nachgewiesen werden (ASSISI und MERKER (1975)). Auf unseren Fall bezogen, bedeutet diese Überlegung, daß wir zunächst nur berechtigt sind, an eine Mineralisationsstörung zu denken. Das Fehlen von alizarinrotpositiven Bereichen kann daher nicht im Sinne einer Aplasie gedeutet werden. Tatsächlich weisen die Rarifizierungen des Alizarinrotbildes und die morphologischen Befunde, besonders die elektronenmikroskopischen Befunde, auf eine verminderte Mineralisation hin. Natürlich ist der technische Aufwand zu hoch, um viele Tiere systematisch durchzuschneiden und zu begutachten. Der bisher noch fehlende Nachweis eines völlig unmineralisierten Skelettstückes ist deshalb durchaus verständlich. Andererseits finden wir in einzelnen Fällen lichtmikroskopische Anhaltspunkte, daß einige der mit der Alizarinrotmethode nicht nachweisbaren Skelettstücke tatsächlich nicht mehr vorhanden waren. Dieser Befund ist ausserordentlich schwer zu deuten und wurde schon in der vorausgegangenen Arbeit diskutiert (MERKER et al. (1975)). Man kann davon ausgehen, daß zu Beginn der Penicillaminbehandlung (Tag 15) bei den Rattenembryonen das fehlende Skelettstück bereits knorpelig angelegt war.Es muss deshalb sekundär resorbiert bzw. auf andere Weise abgeräumt worden sein. Als Ursache ließe sich folgender Mechanismus diskutieren: Die Verhinderung einer Mineralisation durch den Penicillamineffekt auf die organische Matrix könnte einmal die mechanischen Eigenschaften so verringern, daß es bei

Belastungen im größer werdenden Organismus zu Zusammenbrüchen und Kompressionen kommt. Diese Bezirke müssten dann später durch Mesenchymzellen abgeräumt und umgebaut werden.

Von gewisser Bedeutung bei der Diskussion dieser Befunde sind auch nachfolgende Vorstellungen. Unterstellt man, daß auch die dreidimensionale, molekulare Struktur des Kollagens in der Knorpelzellularsubstanz durch D-Penicillamin verändert und damit auch hier die Mineralisation gestört ist, so wäre eine Beeinflussung der Neubesiedlung des Knorpelmodells durch die zweite Mesenchymzellgeneration denkbar. Es muss davon ausgegangen werden, daß die Veränderungen der Interzellularsubstanz des Vorknorpels, die zu einer Mineralisation führen, einen Reiz oder ein Signal für diese Neubesiedlung darstellen. Damit würde aber die Bildung der primären Markhöhle und überhaupt die folgenden Vorgänge der Ossifikation ebenfalls beeinflusst sein. Die fehlerhafte Besiedlung durch die zweite Mesenchymzellgeneration konnte aber auch zu einem Ausbleiben der Weiterentwicklung dieses Skelettstückes und damit zur Aplasie führen. Bei der Diskussion der "kritischen Phase" ist die Kenntnis der Befunde und Vorstellungen sehr wichtig. Während nach der klassischen Ansicht, bei Fehlen eines Skelettstückes, das blastemartige Ursprungsgewebe (Lit. s. CAHEN (1966)), nach etwas modernerer Ansicht auch die Bildung der Interzellularsubstanz (MERKER et al. (1975)), betroffen ist, zeigen diese Untersuchungen, daß auch bereits

voll ausgebildete Knorpelstücke bei Störung der Mineralisation wieder aufgelöst werden können. Eine kritische Periode kommt also auch noch zu einem sehr viel späteren Zeitpunkt vor. Bei der Ratte betrifft das den Abschnitt nach Tag 16. Zu dieser Zeit beginnen die proximalen Skelettanteile im diaphysären Bereich Blasenknorpel zu zeigen. Am frühen Tag 17 treten dann die ersten perichondralen Mineralisations- und Resorptionserscheinungen im Zentrum auf. Ähnliche Überlegungen hat bereits SCHWEICHEL (1971) angestellt. Er konnte sehr spät (Tag 15 und später bei Rattenfoeten) nach Vitamin-A-Gaben Skelettmissbildungen beobachten. Hier geht die Einschmelzung der Skelettstücke über eine Aktivierung des lysosomalen Systems vor sich.

Auf der Grundlage der bisher besprochenen Überlegungen scheint also der wichtigste Effekt des D-Penicillamins die Mineralisationsstörung zu sein. Über diesen Mechanismus läßt sich die Entstehung der Aplasien nach sehr späten Gaben von teratogenen Substanzen im Vergleich mit den klassischen aplasieinduzierenden Substanzen erklären. Das gelingt auch ohne Schwierigkeiten bei der Deutung der Aufhellungen im Bereich der mineralisierten Abschnitte. Da nach unseren elektronenmikroskopischen Befunden die Mineralisation im Bereich der Ossifikationszonen stark vermindert ist und die Farbintensität des Alizarinrotes der Menge der Calzium-Alizarinrot-Komplexe entspricht, muss eine Mineralisationshemmung mit einer abgeschwächten Alizarinroteinfärbung einhergehen. Die Verformungen nach Penicillamin-

behandlung müssen auf eine insuffiziente Stabilisierung der Knorpelmodelle während des Abbaues durch die perichondrale Knochenmanschette zurückgeführt werden. Diese Knochenhülle hält die Form der Knochenanlage intakt, obwohl die diaphysären Bereiche des Knorpels im Innern tiefgreifende Abbauerscheinungen und Höhlenbildungen zeigen. Die mechanischen Eigenschaften der perichondralen Knochenmanschette sind offenbar nach Penicillaminbehandlung durch die besprochenen Kollagenveränderungen und die darauf beruhenden Mineralisationsstörungen nicht mehr vorhanden und es kommt zu Verformungen. Eine deformierte Knorpelanlage wird auch später beibehalten, da die zweite Mesenchymzellgeneration, die die chondrale Ossifikation übernimmt, auf diesem Modell aufwächst. Die Verkürzung der mineralisierten Abschnitte, die über den postulierten Retardierungseffekt hinausgehen, müssen ebenfalls auf eine Mineralisationsstörung bezogen werden. Darüberhinaus ist aber an einen direkten Effekt des Penicillamins auf die mesenchymale Interzellularsubstanz zu denken. Es ist nicht bekannt, ob der Penicillamineffekt mit sekundären Veränderungen, z.B. Volumenveränderungen während der Präparation (Entwässerung) einhergeht. Bei der Beeinflussung des stabilisierenden Kollagengerüstes wäre das möglich. Interessant sind aber einige Hinweise aus der Literatur, die einen Rückkopplungsmechanismus zwischen extrazellulärem Raum und Sekretionsrate bzw. zwischen Qualität des Sekretionsproduktes und Syntheserate vermuten (LANE et al. (1971)).

Vermehrte, niedermolekulare Kollagenstrukturen im Extrazellularraum, würden in diesem Falle die Sekretion hemmen, bzw. ein qualitativ abartiges Kollagen würde in den Hohlräumen des ER verbleiben, weniger gut sezerniert werden und die neue Synthese beeinflussen. Ausserdem muss natürlich auch an eine allgemeine Hemmung der Proteinsynthese gedacht werden, wie sie bei L-Penicillamin auftritt. Beide Möglichkeiten müßten morphologisch erfassbar sein: einmal durch unterschiedliche Füllungsversuche des endoplasmatischen Retikulums, dann durch geringere Ausbildung dieses Zellorganes. Vergleichbare biochemische Befunde an embryonalem Material liegen nicht vor. Beides ist aber in unseren Bildern nicht sicher nachweisbar.

In diesem Zusammenhang sind Untersuchungen interessant, die eine Hemmung der Fibroblastenproliferation nach Gaben von D-Penicillamin in der Gewebekultur zeigen (HERKEN (1975)). Diese Wirkung soll nicht auf der Fähigkeit zur Chelatbildung beruhen und auch nicht mit der Wirkung auf das Kollagen in Verbindung stehen. Eine Verkürzung durch eine Proliferationshemmung der Chondroblasten oder später der Osteoblasten wäre also auch möglich.

Mit dieser Arbeit wurde ausserdem versucht, die Verkürzungen der alizarinrotpositiven Skelettstücke in einer Dosiswirkungskurve zu erfassen. Bei dem gewählten Dosierungsschema gelang das

nicht. Bis zu 500 mg Gesamtdosis von Tag 15 bis Tag 19 war auch mit der genauen Erfassung durch ein automatisches linearanalytisches Meßverfahren keine Verkürzung oder Verringerung der Fläche zu dokumentieren. Da andererseits mit höheren Dosen (1500 mg Gesamtdosis) die Resorptionsrate abrupt emporschnellt (MERKER, persönl. Mitteilung) muss angenommen werden, daß die Dosiswirkungskurve im Hinblick auf die Verkürzung der Röhrenknochen bei 1000 mg/kg sehr steil und kritisch verläuft. Da hier zusätzlich der Retardierungseffekt des D-Penicillamins zu berücksichtigen ist, scheint eine genauere Bearbeitung des Problems mit dieser Substanz im Moment sehr schwierig. Leider kann deshalb auch keine Aussage darüber gemacht werden, ob erstens die automatische Messung genauer ist als die individuelle, und zweitens, ob die Berücksichtigung der Fläche zusätzliche Informationen für diese Fragestellung liefert und in Zukunft bei solchen Messungen berücksichtigt werden muss.

Die vorgelegten Untersuchungen bestätigen die gemeinsam mit der Arbeitsgruppe MERKER (MERKER et al. (1975)) durchgeführten Untersuchungen an weiterem Tiermaterial. Es scheint danach sicher, daß D-Penicillamin eine embryotoxische Wirkung hat, die sich besonders am Skelettsystem von Versuchstieren manifestiert. Eine Wirkung am Menschen, bei dem nach Kenntnis der entsprechenden Vorgänge die Verhältnisse vergleichbar sind, muss deshalb ebenfalls

postuliert werden. Erste Beobachtungen sprechen auch für diese Vorstellung. Ausserdem sichern diese Befunde auch die Arbeitshypothese, daß es nicht nur eine, sondern - in Abhängigkeit vom Zeitpunkt und vom Wirkungsmechanismus der verwendeten Substanz - mehrere "kritische Phasen" gibt. Substanzen, die auf die Synthese, Sekretion und Reifung der mesenchymalen Interzellularsubstanz wirken, konnten sehr spät - bei Ratten bis an das Ende der Schwangerschaft - noch Skelettveränderungen erzeugen.

V. Zusammenfassung

Gravide Ratten vom Wistarstamm Paderborn FW 69 erhielten an dem 15., 16., 17., 18. und 19. Tag der Schwangerschaft intraperitoneale Injektionen von 20, 50 oder 100 mg/Tier D-Penicillamin zweimal täglich.Die Gesamtdosen betrugen also 200, 500 oder 1000 mg pro Tier. Als Kontrollen wurden Tiere verwendet, die entweder nicht behandelt waren oder pro Tag zwei Injektionen NaCl-Lösung erhalten hatten. Nach Schnittentbindung der Embryonen am Tag 20, wurde das Gewicht der Embryonen und die Anzahl der fetalen Resorptionen festgestellt. Die Embryonen wurden licht- und elektronenmikroskopisch untersucht, und nach Alizarinrotdarstellung die Längen der Röhrenknochen mit der Lupe und automatisch linearanalytisch mit dem Digiscan gemessen.
Die Anzahl der Resorptionen war in allen Dosisgruppen nicht signifikant vermehrt. Das Gewicht, die Längen und die Fläche der Knochen waren nur in der Gruppe nach 1000 mg/Tier D-Penicillamin signifikant verringert. Eine Erfassung von Längen- und Flächenveränderungen in den 200 und 500 mg-Gruppen und damit die Aufstellung einer Dosiswirkungskurve, gelang auch mit dem linearanalytischen automatischen Messverfahren am Digiscan nicht. Zahlreiche Veränderungen des Skelettsystems wie das Fehlen, Deformationen und unvollständige Mineralisation einzelner Anteile - wie in einer vorausgegangenen Arbeit bereits berichtet wurde (MERKER et al. (1975)) - kommen vor. Bei der lichtmikroskopischen Untersuchung beobachteten wir eine Hemmung der Ossifikation:

Abnahme der Anzahl und Größe der Knochenbälkchen und Verringerung der Dicke der perichondralen Knochenmanschette. Bei der elektronenoptischen Untersuchung zeigten sich aufgequollene Kollagenfibrillen und das Vorkommen von Apatitkristallaggregaten in kollagenfreien Bezirken. Die Anfangsstadien der Mineralisation werden also erstens durch Penicillamin nicht beeinflusst und sind zweitens nicht abhängig vom Kollagen der Interzellularsubstanz.

Bei den behandelten Tieren findet man einen wechselnden und häufig verringerten Gehalt an Kollagen und Apatitkristallen in den mineralisierten Anteilen. Hier ist das Verhältnis zwischen Apatitkristallen zu Kollagenfibrillen nicht so geordnet wie in den Kontrollschnitten. Dieser zweite Abschnitt der Mineralisation ist also deutlich gestört.

Veränderungen im Aktivitätsverhalten der alkalischen Phosphatase konnten nach D-Penicillamingaben enzymhistochemisch nicht nachgewiesen werden. Eine Beeinflussung der Mineralisation über diesen Effekt ist also wenig wahrscheinlich. Zur Erklärung der beobachteten Wirkungen ist neben einer allgemeinen Retardierung der Entwicklung ein spezifischer Effekt des D-Penicillamins auf das Kollagen am wahrscheinlichsten. Diese Ergebnisse zeigen, daß es möglich ist, mit Substanzen, die in den Synthese- und Reifungsprozeß der mesenchymalen Interzellularsubstanz eingreifen, Missbildungen auch nach der sogen. klassischen kritischen Periode zu erzeugen.

Abb. 1 : Rattenfoeten des Tages 20 nach D-Penicillaminbehandlung. Alizarin-Rot-Aufhellung.

a) Mineralisationsstörung im Bereich der LWS (⊸▷) und Verbiegung der Rippen (⊢▷).

b) Mineralisationsstörung der Schädelknochen (✳) und leichte Mineralisationsstörung im Bereich der LWS (⊸▷) und der SWS (⊸▷). Einseitige Verbiegung der Rippen (⊢▷)

Vergrösserung : 1:4

Abb. 1

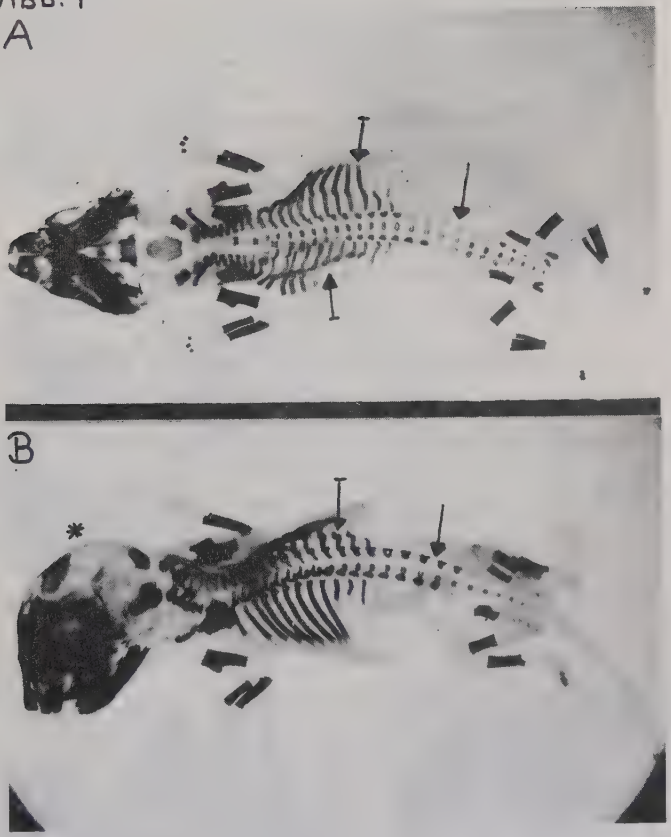


Abb. 2 : Rattenfoeten des Tages 20 nach D-Penicillaminbehandlung. Alizarin-Rot-Aufhellung.

a,b) Mineralisationsstörung der LWS. Rippen und Extremitäten normal.

c) Deutliche Verbiegung der Rippen und Verminderung der Alizarin-Rot-Bindung, d.h. geringerer Mineralisationsgrad der Rippen.

Vergrösserung : a, b) 1:10
c) 1:15

Abb. 2

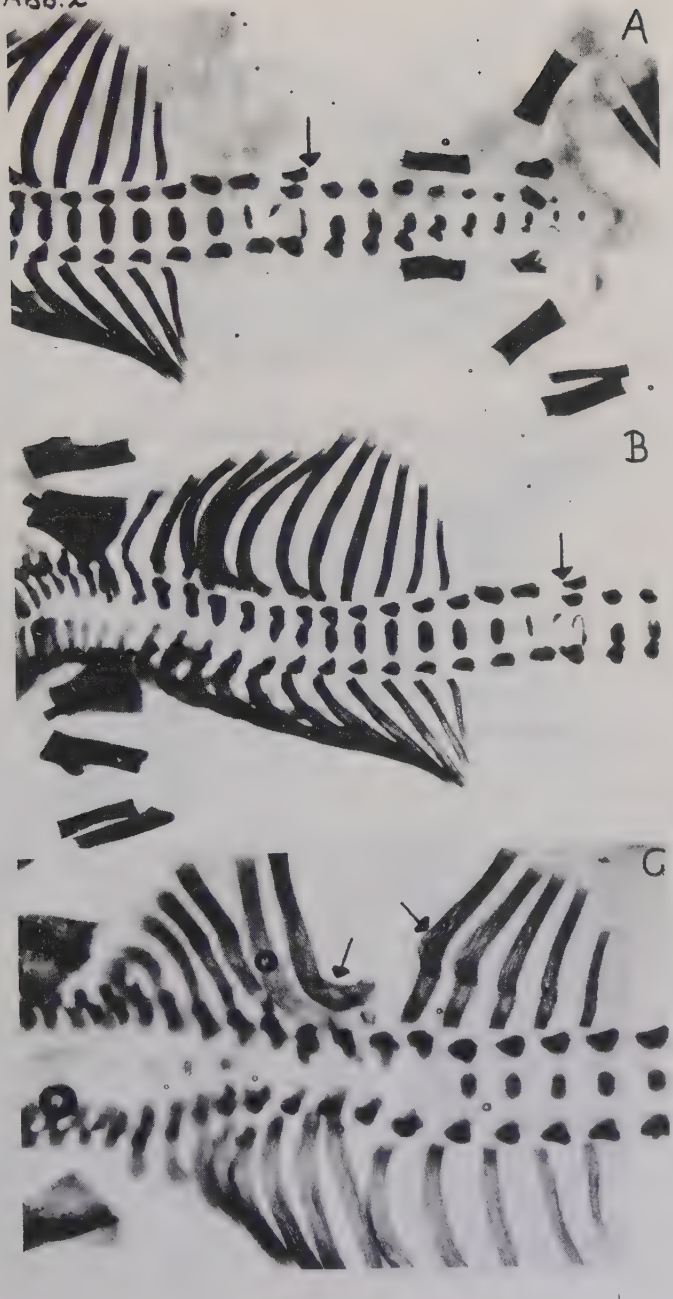


Abb. 3 : Rattenfoeten des Tages 20 nach D-Penicillaminbehandlung. Alizarin-Rot-Aufhellung.

a) Fehlende Mineralisation der ossa occipitalia und interparietalia (✳). Verminderte Mineralisation in den anderen Schädelknochen (✕)

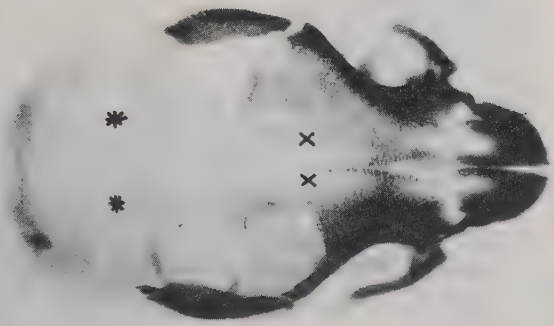
b) Mangelhafte Mineralisation in den Knochen des Schädeldaches (⊸▷). Typische angedeutete Verbiegung der Unterarmknochen (⊢▷)

c) Verminderte Mineralisation von Scapula (I), Humerus (II), Radius (III) und Ulna

Vergrösserung : 1:8

Abb. 3

A



B

C

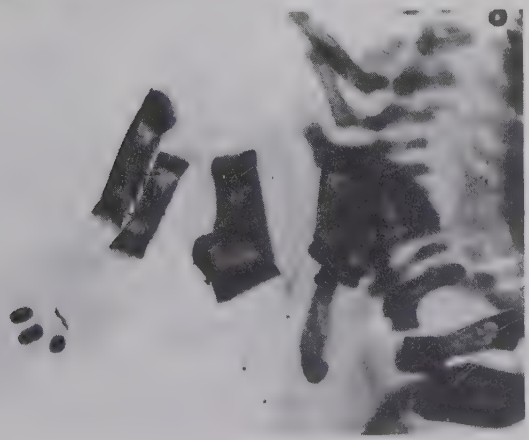


Abb. 4 : Rattenfoeten des Tages 20 nach D-Penicillaminbehandlung

a) Histologisches Übersichtsbild einer vorderen Extremität. HE-Färbung. Leichte Verbiegung der Unterarmknochen (⊣▷) und des Humerus (⊢▷)

b) Histologisches Bild der schräggeschnittenen Unterarmknochen. PAS-Färbung. Knorpel weitgehend normal, fast vollständig fehlende perichondrale Knochenmanschette (⊣▷), fast vollständiges Fehlen der enchondralen Ossifikation im primären Markraum (✳)

c) Folgeschnitt von b. HE-Färbung.

Vergrösserung : a) 1:20
b, c) 1:60

Abb. 4

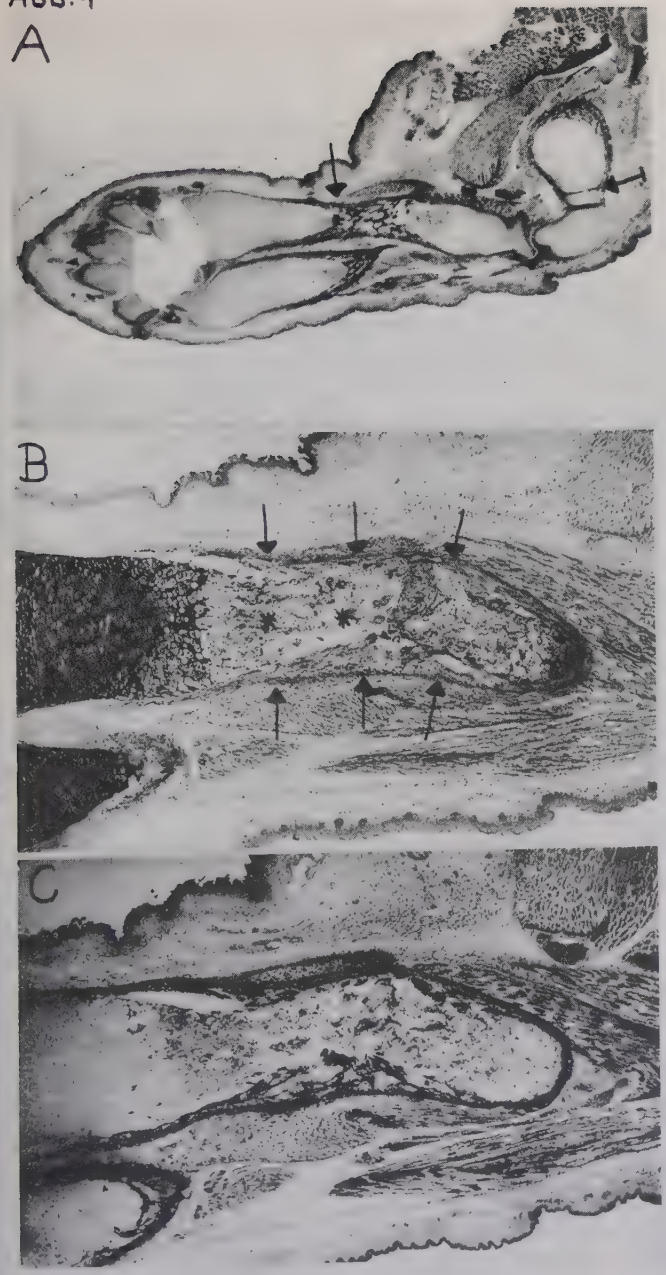


Abb. 5 : Rattenfoeten des Tages 20 nach D-Penicillaminbehandlung

Elektronenmikroskopische Aufnahme aus dem Bereich der perichondralen Knochenmanschette des Humerus.

Osteoblasten (Ob) mit zahlreichen Hohlräumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER). Im Interzellularraum (I) zahlreiche kollagene Fibrillen, Bonucci-Körper (⟶▷) und erste Mineralisationspunkte (O).

Vergrösserung : 1:24.000

5
ER
I
OB
ER
ER
OB
I
I
ER
O
I
OB

Abb. 6 : Rattenfoeten des Tages 20 nach D-Penicillaminbehandlung

Elektronenmikroskopische Aufnahme aus dem Bereich der perichondralen Knochenmanschette des Humerus. Noch nicht zusammengeflossene Apatitkristallaggregate (⇨), daneben zahlreiche Schräg- und Querschnitte von kollagenen Fibrillen, die entweder dünn sind, d.h. ungeschwollen (1), oder dicker, d.h. geschwollen (2).

Vergrösserung : 1:30.000

1
2
2
1
2
1
2

Abb. 7 : Rattenfoeten des Tages 20 nach D-Penicillaminbehandlung

Elektronenmikroskopische Aufnahme aus dem Bereich der enchondralen Ossifikation in der primären Markhöhle des Humerus. Unterschiedlich grosse Apatitkristallniederschläge (✳) neben Mesenchymzellfortsätzen (M). Im übrigen Interzellularraum (I) fast keine Kollagenstrukturen nachweisbar.

Vergrösserung : 1:55.000

Abb. 7

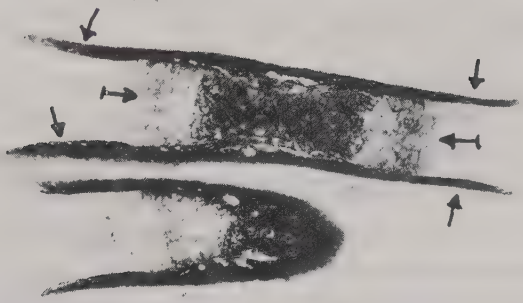
Abb. 8 : Darstellung der alkalischen Phosphatase in Rattenembryonen des Tages 20

Besonders starke Anfärbung im Bereich der perichondralen Knochenmanschette (⏚), der chondralen Ossifikation im primären Markraum (✳) und im Bereich des mineralisierenden Vorknorpels (⏚)

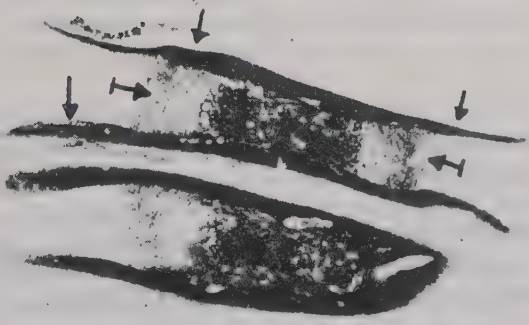
a) Unbehandelte Kontrolle

b) D-Penicillamin-behandelt (1000 mg) Keine deutlichen Abweichungen gegenüber der Norm.

Abb. 8



A



B

Abramovich, A. Devoto, F.C.H.: Anomalous maxillofacial patterns produced by maternal lathyrism in rat foetuses. Arch. Oral. Biol. 13, 823-826 (1968)

Assisi, A, Merker, H.J.: Über eine besondere Form von Extremitätenmissbildungen bei Ratten von 6-Merkaptopurin am Tag 12 der Schwangerschaft. Arzneimittel-Forsch., im Druck

Aydelotte, M.B.: Influence of azetidine-2-carboxylic acid on developing mouse limb cartilage in vitro. Anat. Rec. 169, 269-270 (1971)

Aydelotte, M.B., Kochhar, D.M.: Development of mouse limb buds in organ culture: Chondrogenesis in the presence of a proline analog, L-azetidine-2-carboxylic acid. Develop. Biol. 28, 191-201 (1972)

Bachra, B.N., Fischer, H.R.A.: Mineral deposition in collagen in vitro. Calc. Tiss. Res. 2, 243-251 (1968)

Bevelander, G., Nakahara, H., Rolle, G.K.: The effect of tetracycline on the development of the skeletal system of the chick embryo. Develop. Biol. 2, 298-306 (1960)

Cahen, R.L.: Experimental and clinical chemoteratogenesis. Advances in Pharmacol. 4, 263-349 (1966)

Carter, M.P., Wilson, F.: Tetracycline and congenital limo abnormalities. Brit.Med. J. 1962 II, 407-409

Deshmukh, K. Nimni, M.E.: A defect in the intramolecular and intermolecular cross-linking of collagen caused by penicillamine. J. biol. Chem. 244, 1787-1795 (1969)

Dingle, J.T., Fell, H.B., Lucy, J.A.: Synthesis of connective tissue components. The effect of retinol and hydrocortison on cultured limb bone rudiments. Biochem. J. 98, 173-182 (1966)

Fell, H.B. Mellanby, E.: The effect of hypervitaminosis A on embryonic limb bones cultivated in vitro. J. Physiol. (Lond.) 116, 320 (1952)

Fell, H.B., Weiss, L.: The effect of antiserum, alone and with hydrocortisone, on foetal mouse bones in culture. J. exp. Med. 121, 551-560 (1965)

Glimscher, M.J., Hodge, A.J., Schmitt, F.O.: Macromolecular aggregation states in relation to mineralization. The collagenhydroxyapatit as studied in vitro. Proc. Nat. Acad. Sci.43, 860-864 (1957)

Grote, W., Micah, F.: Tierexperimentelle Untersuchungen zur Frage der Teratogenität von Tetracyclin. Arzneimittel-Forsch. (Drug Res.) 21, 683-685 (1971)

Hall, B.K.: Skeletal defects in embryonic chicks induced by administration of beta-aminopropionitile. Teratology 5, 81-88 (1972)

Hallsworth, A.S.: Aspects of calcification. Biochem. J. 93, 232-260 (1964)

King, C.T.G., Horigan, E., Wilk, A.L.: Fetal outcome from prolonged versus acute drug administration in the pregnant rat. Advanc. exp. Med. Biol. 27, 1-14 (1972)

Lane, J.M., Dehm, P., Prockop, D.J.: Effect of the proline analogue azetedine-2-carboxylic acid on collagen synthesis in vivo. I.Arrest of collagen accumulation in growing chick embryos. Biochim. biophys. Acta (Amst.) 236, 517-527 (1971)

Larsson, S.E., Ray, R.D., Knettner, K.E.: Microchemical studies on acid glucosaminoglycans of the epiphyseal zones during enchondral calcification. Calc. Tiss. Res. 13, 271-285 (1973)

Levene, C.L., Gross, J.: Alterations in state of molecular aggregation of collagen induced in chick embryos by beta-aminoproprionitrile (Lathyros factor). J. exp. Med. 110, 771-779 (1959)

Longden, M.: Die Wirkung von Tetracyclinen auf die Skelettentwicklung. Inaugural-Dissertation, FU-Berlin (1974)

McCallum, H.P., Arbuthnott, J.P.: The inhibition of cartilage matric production by glutamylaminoacetonitrile in vitro. Exp. molec. Path. 11, 232-246 (1969)

Merker, H.J.: Die Kapitel "Knochengewebe" und "Knorpelgewebe" in: Benninghoff-Goertler, Anatomie des Menschen. Urban und Schwarzenberg, München-Berlin-Wien (1975)

Merker, H.J.: Considerations on problem of "oritical period" during limb bud development. Tilisee-Symposium, Juni 1975, im Druck (Hrsg. Lenz, W.)

Merker, H.J., Franke, L., Günther, Th.: The effect of D-penicillamin on skeletal development of rat foetuses. Naunyn-Schmideberg's Arch. Pharmacol. 287, 359-376 (1975)

Merker, H.J., Mewes, P., Pospisil, M.: Cytotoxic effect of 6-Mercaptopurin on the blastemal cells in limb buds of rat embryos. Teratology 11, 199-218 (1975)

Meyer, I.L., Eick, I.D., Nancolla, G.H., Johnson,E.N.: A scanning electron microscopig study of the growth of hydroxyapatit-crystals. Calc. Tiss. Res. 10, 91-102 (1972)

Nimni, M.E., Deshmukh, K., Deshmukh, A.: Mechanism of inhibition of collagen crosslinking and depolymerisation of an incompletely cross-linked form of insoluble collagen caused by D-penicillamine. In: Chemistry and molecular biology of the intercellular matrix, Vol. 1, pp. 417-430 London-New York: Academic Press 1970

Nimni, M., Deshmukh, K., Gerth, N., Bavetta, L.A.: Changes in collagen metabolism associated with administration of penicillamine and various amino and thiol compounds. Biochem. Pharmacol. 18, 707-710 (1969)

Nimni, M.E., Deshmukh, H., Gerth, N.: Collagen defect induced by penicillamine. Nature New Biol. 240, 220-221 (1972)

Patnaik, B.K.: Studies on collagen as a template for calciumapatit. Gerontologia 16, 96-103 (1970)

Ponsetti, I.V., Shepard, R.S.: Lesion of skeleton and of other mesodermal tissues in rats fed sweet pea (Lathyrus odoratus) seeds. J. Bone J. Surg. 36A, 1031 (1954)

Pratt, R.M., King, C.T.G.: Inhibition of collagen cross-linking associated with β-amino-proprionitrile-induced cleft palate in the rat. Develop. Biol. 27, 322-328 (1972)

Raab, W., Mörth, C.: Inhibition of alkaline phosphataseactivity by D-penicillamin. Z. Klin. Chem. Klin.Biochem.12, 309-310 (1974)

Rajan, K.T.: The cultivation of post foetal mammalian cartilage and its response to hypovitaminosis A. Exp. Cell Res. 55, 419 (1969)

Rajan, K.T.: Studies of bone and cartilage in organ culture. Teratology 4, 498 (A) (1971a)

Rajan, K.T., Hill, A.G.S., Hopkin, A.M.: Effect of biologically active substance in human cartilage in culture. VII. Europ. Rheumatol. Congr. 42, 7-15 (1971b)

Robinson, R.A.: An electron microscope study of the crystalline inorganic component of bone at its relationship to the organic matrix. J. Bone J. Surg. 34 A, 389-435 (1952)

Saxen, L.: Tetracycline: effect of osteogenesis in vitro. Science 149, 870-872 (1965)

Saxen, L.: Effect on tetracycline on osteogenesis in vitro. J. exp. Zool. 162, 269-294 (1966a)

Saxen, L.: Drug induced teratogenesis in vitro: Inhibition of calcification by different tetracyclines. Science 153, 1384-1387 (1966b)

Schumacher, B., Merker, H.J.: Die Bedeutung der Knochenlängen neugeborener Versuchstiere für die Beurteilung des teratogenen Risikos. In Vorbereitung

Schweichel, J.U.: The influence of oral vitamin A doses on interdigital necroses in the limb bud of the rat. Teratology 4, 501 (A) (1971)

Steffek, A.J., Hendrick, A.G.: Lathyrogen-induced malformations in baboons: A preliminary report. Teratology 5, 171-179 (1972)

Steffek, A.J., Verrusio, A.C., Watkins, C.A.: Cleft palate production in rodents treated with lathyrogenic agents. Teratology 5, 71-80 (1972)

Stivers, F.E., Steffek, A.J., Yarington, C.T.: The effect of lathyrogens on developing midfacial structures in the rat. J. Surg. Res. 11, 415-420 (1971)

Teller, C., Merker, H.J., Günther, Th.: Über das Verhalten und die Lokalisation der alkalischen Phosphatase während der Skelettentwicklung bei Rattenfoeten. Histochemie 27, 193-204 (1971)

Wilk, A.L., King, C.T.G., Horigan, E.A., Steffek, A.J.: Metabolism of beta-aminoproprionitrile and its teratogenic activity in rats. Teratology 5, 41-48 (1972)

Herrn Professor Dr. med. H.-J. Merker
danke ich herzlich für die Überlassung
des Themas und für die freundliche
Hilfe bei der Durchführung der Arbeit.

Herrn Professor Dr. med. E. Wüstenfeld
sowie den Assistenten und anderen
Mitarbeitern des II. Anatomischen
Instituts der Freien Universität Berlin
danke ich ebenfalls für die stets
freundlich gewährte Unterstützung.

Lebenslauf

3.4.1945	geboren in Göttingen Vater : Dr.med.dent. Karl-August Franke Mutter: Margarete Franke geb. Schröder
1951	Einschulung in die Volksschule Letter
1954-1966	Besuch der Freien Waldorfschule in Hannover
1966	Reifeprüfung
1966	stud. phil.
1966-1973	Medizinstudium an der Freien Universität Berlin
1973	Ärztliche Prüfung
1973-1974	Medizinalassistentenzeit Nov. 1973-Febr. 1974: Chirurgische Abt. des Martin-Luther-Krankenhauses in Berlin April-Juni 1974: II. Anatomisches Institut der FU Berlin Juli-Dez. 1974: II. Innere Abt. des Städt. Krankenhauses Moabit in Berlin
14.12.1974	Approbation als Arzt
Jan.-Aug. 1975	Assistenzärztin an der II. Inneren Abt. des Städt. Krankenhauses Moabit in Berlin
Sept. 1975 bis heute	Facharztausbildung an der Gynäkologischen und Geburtshilflichen Abt. des Evangelischen Waldkrankenhauses in Berlin